

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE
ARMAZENAGEM NA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS E NA
COMPOSIÇÃO IÔNICA DA DENTINA RADICULAR: ESTUDO *in vitro*.**

Aracaju

2015

IVANILTON ALAN DE SOUZA SILVA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE
ARMAZENAGEM NA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS E NA
COMPOSIÇÃO IÔNICA DA DENTINA RADICULAR: ESTUDO *in vitro*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da Silva

Aracaju

2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S586 Silva, Ivanilton Alan de Souza
Análise da influência de diferentes meios de armazenagem na viabilidade de fibroblastos e na composição iônica da dentina radicular: estudo *in vitro* / Ivanilton Alan de Souza Silva ; orientador Luiz Carlos Ferreira da Silva. – Aracaju, 2015.
42 f.

Dissertação (mestrado em Odontologia)– Universidade Federal de Sergipe, 2015.

1. Odontologia. 2. Ligamento periodontal. 3. Avulsão dentária. 4. Meios de cultura. 5. Fibroblastos. I. Silva, Luiz Carlos Ferreira da, orient. II. Título.

CDU 616.314



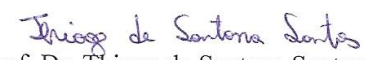
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA


Ata da sessão de Defesa de Dissertação
de Mestrado de **IVANILTON ALAN DE SOUZA SILVA**


Às dez horas do dia vinte e sete de Fevereiro de dois mil e quinze, realizou-se na Sala Teórica, do Departamento de Odontologia, Campus da Saúde da Universidade Federal de Sergipe, a sessão pública de defesa de dissertação de Mestrado em Odontologia de **IVANILTON ALAN DE SOUZA SILVA** sob o título: “**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE ARMAZENAGEM NA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS E NA COMPOSIÇÃO IÔNICA DA DENTINA RADICULAR: ESTUDO *in vitro***.” presidida pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da Silva, na qualidade de orientador, que por sua vez passou a palavra ao candidato para proceder a apresentação do seu trabalho. Logo após, o primeiro examinador, Prof. Dr. Thiago de Santana Santos, arguiu o candidato que teve igual período para defesa. O mesmo aconteceu com o segundo examinador, Prof. Dr. Paulo Almeida Junior. Em seguida, o Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da Silva, orientador do candidato, teceu comentários sobre o trabalho apresentado. Encerrada esta etapa, os presentes retiraram-se do recinto, permanecendo apenas a banca examinadora para avaliação. Após esta, a banca decidiu considerar o candidato **APROVADO**. Nada mais havendo a tratar, a presente ata foi lavrada e, depois de lida e aprovada, será assinada pela banca examinadora e pelo mestrando.

Aracaju, 27 de Fevereiro de 2015


Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da Silva
Orientador


Prof. Dr. Thiago de Santana Santos
1º Examinador (UNIT)


Prof. Dr. Paulo Almeida Junior
2ª Examinador (UNIT)


Ivanilton Alan de Souza Silva
Mestrando

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem ele esse sonho não seria possível. Agradeço muito por iluminar o meu caminho e por ter me dado forças nos momentos de maiores dificuldade para continuar lutando.

Aos meus pais e irmão, pela compreensão, incentivo e por acreditar em mim, me apoiado em todos os momentos. Por estar sempre ao meu lado não importando a situação. Muito Obrigado!

Ao meu orientador Professor Luiz Carlos Ferreira da Silva, por nunca ter desistido de mim mesmo nos meus momentos de fraqueza. Sem ele este trabalho nunca seria concluído.

Ao Programa de Pós-Gaduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, no qual esta parceria de programas possibilitou a realização integral do trabalho. Em especial, ao professor Carlos José Soares, a professora Priscilla Barbosa Ferreira Soares, professora Manuella Verdinelli de Paula Reis, que me guiaram em cada etapa além de contribuírem para o meu crescimento profissional.

A todos do Programa de Pós-Gaduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia que me acolheram num momento difícil e corrido e mesmo não atuando diretamente, me auxiliaram em momentos de necessidades.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFS que fizeram parte dessa conquista.

Aos meus amigos de curso pela paciência, companheirismo, sinceridade e assistência no decorrer deste trabalho e de todo mestrado.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta fizeram parte dessa etapa da minha vida.

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos Possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho

(Dalai Lama)

RESUMO

Para preservação das células do ligamento periodontal após um caso de avulsão dentária torna-se imprescindível a determinação de um meio de armazenagem. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos de diferentes meios de conservação na viabilidade celular e na composição iônica da dentina radicular de dentes bovinos em quatro períodos experimentais. Células de fibroblastos imortalizados humanos foram cultivadas em frascos contendo meio eagle modificado de Dulbecco (DMEM), e após atingir confluência as células foram tripsinizadas, contadas em hemocitômetro e plaqueadas. O meio de cultura foi removido de cada poço e as células foram expostas a diferentes tempos e meios de conservação: GLi - leite integral; GRl - ringer lactato; GPv - solução de própolis vermelho e GPd - pedialyte. DMEM foi considerado grupo controle positivo e, água de torneira, o controle negativo. Após os períodos experimentais de 15, 30, 45 e 60 minutos, foi aplicado o método colorimétrico MTT formazan para avaliar a viabilidade. Para análise de composição superficial da dentina radicular, foi utilizada a espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier (FTIR) onde, foram coletados 60 incisivos bovinos para confecção de amostras de 3x3 mm de dentina radicular extraída da região cervical. As amostras foram divididas aleatoriamente entre grupos experimentais em diferentes tempos. Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística empregando análise de variância em fator único para os meios de armazenagem dentro de cada tempo, e o fator tempo para cada meio de armazenamento, seguido dos teste de Dunnet e Teste de Tukey ($P < 0,05$). Nos tempos de 15 e 60 minutos, dentre os meios analisados, o leite integral e o ringer com lactato apresentaram resultados superiores quando comparados ao controle negativo. Entretanto, nos tempos de 30 e 45, minutos somente o leite integral apresentou resultados satisfatórios. Quando comparamos com o DMEM, somente o leite integral apresentou resultados estatísticos similares. Sendo assim, avaliando a viabilidade celular, o leite integral apresentou níveis de viabilidade celular similar ao controle positivo e superior aos demais meios testados. No período de 60 minutos de armazenagem, aquele mais comumente realizado nas condições clínicas, o meio Ringer com lactato apresentou desempenho superior ao própolis vermelho e ao pedialyte, e estes, similares à água de torneira (controle negativo).

Palavras-chave: Ligamento Periodontal; Avulsão Dentária; Meios de Cultura; Fibroblastos; Sobrevivência Celular

ABSTRACT

For preservation of periodontal ligament cells after one tooth avulsion becomes necessary to determine a storage medium. The aim of this study was to analyze the preservation of human fibroblast cells and analyze the composition of root dentin of bovine teeth in different storage media. Immortalized human fibroblasts cells were grown in flasks containing Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), and after reaching confluence the cells were trypsinized, counted by hemocytometer and plated. The culture medium was removed from each well and the cells were exposed at different times in the solutions: GLi - milk; GRl - ringer's lactate; GPv - red propolis solution and GPd - Pedialyte. DMEM was considered positive control group and tap water was the negative control. After the experimental period of 15, 30, 45 and 60 minutes, we used the colorimetric method MTT formazan. For analysis of surface composition of root dentin, we used Fourier transform infrared (FTIR) where, we collected 60 bovine incisors. Samples were extracted from the cervical region of the root dentin in 3x3mm. The samples were randomly divided among experimental groups in different times. Data were tabulated and statistically analyzed using analysis of variance for the storage media within each time and the time factor for each storage medium, followed by Dunnet test and Tukey's test ($P < 0.05$). In 15 and 60 minutes, from the media types, the milk and Ringer's lactate showed better results when compared to the negative control. However, in 30 and 45 minutes only the milk showed satisfactory results. A comparison with DMEM only the milk showed similar statistical results. In assessing the viability of human fibroblasts, milk showed cell viability levels similar to the positive control and superior to other media tested. Within 60 minutes storage, the one most commonly used in clinical conditions, the ringer's lactate has higher performance than the red propolis and the pedialyte and these similar to tap water (negative control).

Keywords: Periodontal Ligament; Dental avulsion; Culture Media; Fibroblasts; Cell Survival

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Objetivos.....	13
2.1.Objetivo Geral	13
2.2.Objetivos Específicos	13
3. Metodologia.....	14
3.1. Tipo de Estudo	14
3.2. Local do Experimento.....	14
3.3.Cultura de Células.....	14
3.4. Avaliação da viabilidade celular.....	14
3.5. Análise da composição da dentina radicular	18
3.5.1. Obtenção dos fragmentos da dentina	18
3.5.2. Análise dos fragmentos no FTIR	20
3.5.3. Análise dos dados obtidos.....	21
3.6.Análise estatística	22
4. Resultados	23
5. Considerações Finais	39
6. Comunicado à Imprensa	40
Referências	41

1 INTRODUÇÃO

O termo avulsão, é usado para descrever uma situação em que, um dente é deslocado por completo do alveolo, resultando em trauma dento alveolar grave¹. Devido à complexidade desta lesão, o suprimento neurovascular é severamente comprometido, na maioria dos casos, causando perda de vitalidade pulpar. Os fatores etiológicos mais prevalentes são, os traumas decorridos de luta e esportes, bem como quedas e colisões contra objetos duros². O reimplante imediato é considerado como o tratamento ideal para esse tipo de trauma, mas nem sempre é possível sua realização,³ e consequentemente, o reimplante tardio é comumente presente. O tempo e o meio de armazenamento extraoral, são dois dos fatores mais importantes na determinação da viabilidade de células restantes do ligamento periodontal e, portanto, influenciam nas capacidades curativas do ligamento periodontal em um dente avulsionado. Imediatamente, após a avulsão, o número de células viáveis do ligamento periodontal tende a decair com o decorrer do tempo extraoral, e no decorrer de 2 horas torna-se impossível detectar células viáveis. Na prática clínica, o reimplante tardio de dentes sem nenhum meio de conservação, não apresentam o mesmo manejo clínico e prognóstico, como o reimplante tardio de dentes mantidos em soluções de armazenamento^{4,5,6}.

O meio de armazenamento ideal, deve apresentar o valor de PH e osmolaridade fisiológica adequados, devendo incluir a presença de substâncias nutritivas que permitem a sobrevivência das células do ligamento periodontal. Além disso, o meio de armazenamento deve estar prontamente disponível e ser simples de manusear⁷. Atualmente, vários meios de armazenamento, como a Saliva, Soro Fisiológico, Leite, meios de cultura, solução salina balanceada de Hank's (HBSS) e viaspan, foram examinados e alguns outros meios de conservação foram testados recentemente, sendo eles, a água de coco, extrato de própolis, albumina de ovo, *gatorade*, chá verde^{3,7}.

O leite integral, apesar da sua consagração, ainda continua sendo bastante estudado. Possuindo PH e osmolaridade fisiológica, o leite possui a capacidade de manter as células viáveis fornecendo nutrientes¹⁴ sendo que, o tempo pode influenciar no PH do leite, reduzindo-o e comprometendo sua qualidade. Na sua composição também há presença de gordura que, por sua vez, afeta a viabilidade celular. Devido a fácil disponibilidade e praticidade, o leite integral, é o meio mais adotado nos casos de avulsão dentária sendo eleito pela Associação

Americana de Endodontistas como solução de armazenagem para transporte do dente avulsionado^{8,9,10,11}.

A água de torneira, é descrita como um meio inadequado para conservar as células do ligamento periodontal, devido a sua baixa osmolalidade e presença de cloro⁹. Em um estudo, Lindskog e Blomlöf (1981), concluíram que, após 3 horas de armazenamento neste meio, todas as células do ligamento periodontal foram perdidas. A partir dos resultados da água, sua aplicabilidade em trabalhos é unicamente de comparação como controle negativo.

O meio eagle modificado Dulbecco (DMEM), também usado para o cultivo de células suplementado com soro fetal bovino, possui sal, glicose, vitaminas, aminoácidos, antibióticos além de fatores de crescimento e alto teor de gama-globulina. Este meio de Eagle mostrou-se superior a outros meios testados além de ser um excelente meio para conservação de células, se fosse facilmente obtido. Fibroblastos viáveis e com capacidade de divisão foram observados após 1 ano de armazenamento em meio de Eagle suplementado com nutrientes, soluções tampão e antimicrobiana. Pesquisadores relataram que após um período de secagem de 60 min, a pré-imersão de dentes de macacos em meio de Eagle, por 5, 7 ou 14 dias, melhorou a condição periodontal, diminuindo o percentual de reabsorção inflamatória após o reimplante¹².

O ringer com lactato apresenta uma concentração de sódio de 130 mmol / L, a concentração de cloreto de 109 mmol / L, o nível de cálcio de 2,7 mmol / L, o nível de HCO₃ de 2,7 mmol / L a partir do metabolismo do lactato e osmolaridade de 265 mOsm / L ; tanto [Na +] e osmolaridade são ligeiramente abaixo dos valores de plasma,¹³ composição que se assemelha com a concentração ideal para a conservação das células do ligamento periodontal.

O própolis é uma substância resinosa natural, não-tóxica que foi coletada a partir de vários tipos de plantas por abelhas para cobrir e proteger a colméia. Atualmente, o própolis tem sido empregado na Medicina e Odontologia por causa de seus efeitos anti-inflamatórios, anti-sépticos, de cura e propriedades antimicrobianas. Além dessas características, o própolis contém elementos que têm sido essenciais durante a síntese de colágeno^{14,15,16}. Por mais de 30 anos o própolis brasileiro é estudado no setor da farmacologia e da química. Dentre os tipos de própolis encontramos o própolis vermelho que é extraído no nordeste do Brasil e apresenta capacidade antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, antioxidante, antitumoral entre outros.¹⁷ Em 2014, Frozza e colaboradores¹⁸, analisaram 3 proporções de própolis vermelhos (6µg/ml, 60µg/ml e 120µg/ml) com intuito de avaliar suas propriedades frente a células tumorais chegando a conclusão de que, somente o própolis vermelho 6µg/ml não apresenta citotoxicidade mostrando-se compatível com o grupo controle.

Pedialyte® é uma solução de manutenção do eletrólito via oral, que repõe os líquidos e nutrientes perdidos essenciais para as células. Pedialyte tem sua composição semelhante à Ricentral. Pedialyte contém citrato de Potássio monoidratado (1,080g), cloreto de sódio (1,038g), citrato de sódio diidratado (470mg), ácido cítrico anidro, gliconato de Zinco (30,5mg) e glicose monoidratada (12,5g) apresentando na sua composição o arroz cozido em adição aos eletrólitos. Sua disponibilidade em farmácias também o torna prático em casos de acidentes¹².

Sendo assim, o propósito desse estudo é de avaliar a influência de diferentes meios de armazenagem na viabilidade de fibroblastos humanos além de analisar a composição iônica da dentina radicular por meio de espectrômetro de infravermelho.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade de fibroblastos humanos e analisar a composição iônica da dentina radicular de dentes bovinos em diferentes meios de conservação em quatro períodos experimentais.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar o potencial do ringer com lactato, do própolis e do pedialyte em manter a viabilidade de fibroblastos de boca imortalizados comparando-os ao leite integral bovino e ao meio eagle modificado Dulbecco (DMEM) e a água de torneira em quatro períodos experimentais, usando o método de MTT formazan.
- Analisar a composição iônica da dentina radicular por meio do espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) antes e após a armazenagem nas soluções experimentais, em quatro períodos experimentais.

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo

Neste trabalho foi realizada uma pesquisa laboratorial sendo um estudo in vitro, com caráter exploratório e comparativo utilizando-se uma abordagem indutiva.

3.2 Local do Experimento

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa Odontológico Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular – CPbio, na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU), no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

3.3 Cultura das células

Células de fibroblastos imortalizados humanos (banco de células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram cultivadas em frascos T-25 de cultura de células contendo meio eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (Invitrogen, Branchburg, NJ, EUA), 100 unidades de mL^{-1} de penicilina/estreptomicina (Sigma Chemical Co.) em incubadora de humidificador com 5% de CO_2 e 95% de ar a 37°C . O crescimento foi permitido até as células atingirem confluência de 80%. Estas células foram tripsinizadas (1 ml), contadas em hemocitômetro, e plaqueadas em placas 96 poços (Coastar Corp, Cambridge, MA, EUA,) em densidade de 2×10^4 células por poço em 100 μL de meio de cultura. As placas foram devolvidas à estufa de CO_2 por 48 horas.

3.4 Avaliação da viabilidade celular

Após 48 horas de plaqueamento o meio de cultura foi removido de cada poço e as células foram expostas a 100 μL de diferentes soluções experimentais (Figura 1), à temperatura ambiente, para os tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos. As soluções de armazenamento foram

leite integral, ringer com lactato, extrato de própolis vermelho, pedialyte, água de torneira e meio eagle modificado Dulbecco (Quadro 1).

Quadro 1: Disposição dos meios experimentais com PHs e Osmolaridades.

GRUPO		PH	Osmolaridade
GLi	Leite integral (CALU, Uberlândia, MG, Brasil)	6.65	280 mOsm/l
GRI	Ringer com lactato (HalexIstar, Hospitalar, Goiânia, Brasil)	6.0	274,4 mOsm/l
GPv	Extrato de própolis vermelho 6 µg/ml (Manipulada em álcool e água 50/50, de acordo com o trabalho de Frozza, 2014)	6.38	70 mOsm/l
GPd	Pedialyte (ABBOTT, São Paulo, SP, Brasil)	3.98	250 mOsm/l
GAt	Água de torneira – Controle Negativo	6.18	24 mOsm/l
GDm	Meio eagle modificado Dulbecco (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) – Controle Positivo	8.56	310 mOsm/l



Figura 1: Meios experimentais – (a)meio eagle modificado Dulbecco (DMEM), (b)água de torneira, (c) extrato de própolis vermelho, (d)pedialyte, (e)ringer com lactato e (f)leite integral.

Após os tempos experimentais, as soluções foram descartadas e acrescido 20% de DMEM em solução de MTT (3-[4, 5-dimethylthiazolyl-2]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (5 mg. mL⁻¹) para avaliação da viabilidade celular (Figura 2). O mesmo protocolo foi utilizado para o grupo de controle positivo (DMEM).

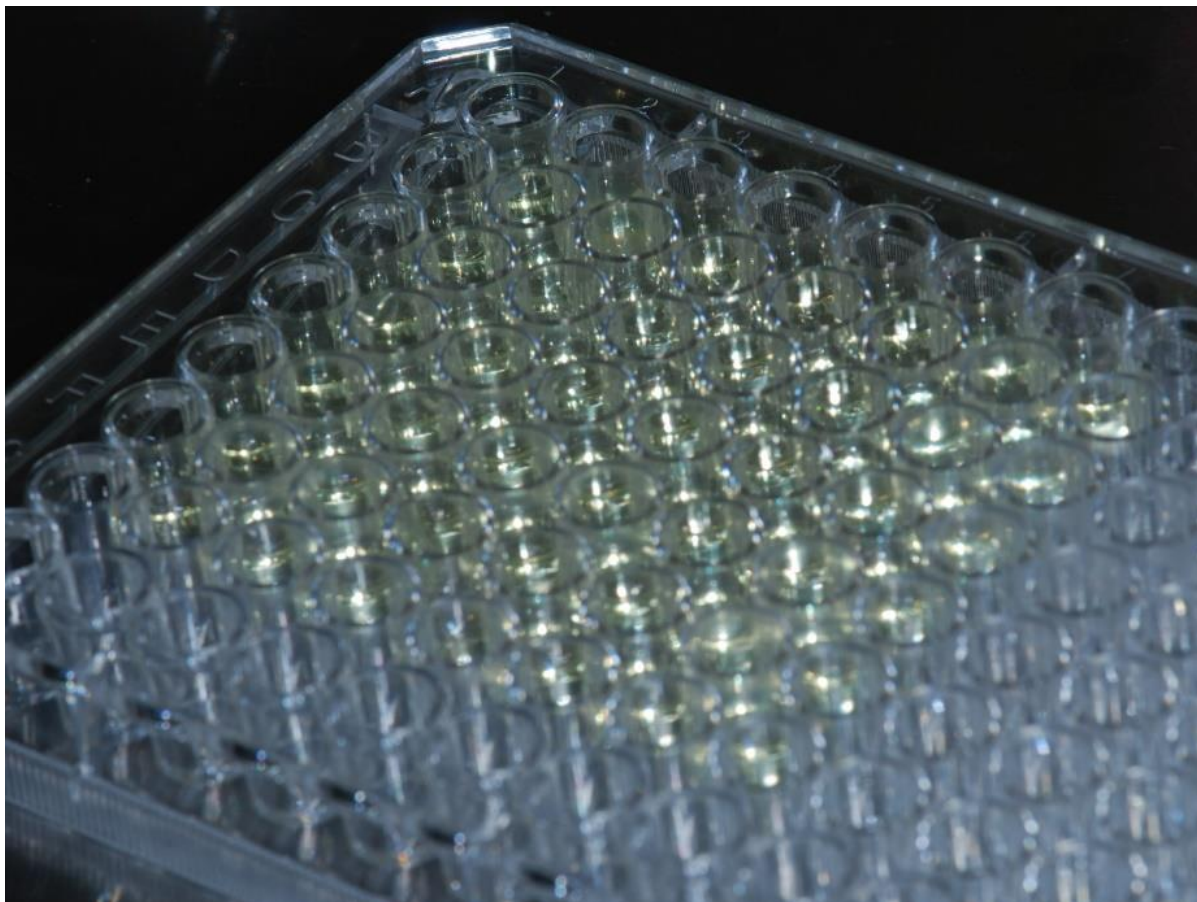


Figura 2: Solução de MTT para avaliação da viabilidade celular.

Após 4 h, a solução de MTT (3-[4, 5-dimethylthiazolyl-2]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) foi removida e 100 μ L de dimetil sulfoxido (Sigma Chemical Co.) foram adicionados a cada poço (Figura 3). A absorbância das amostras foi determinada por um leitor automático de microplacas (The Biochrom Asys UVM340, Cambridge, United Kingdom), em comprimento de onda de 570nm (Figura 4).

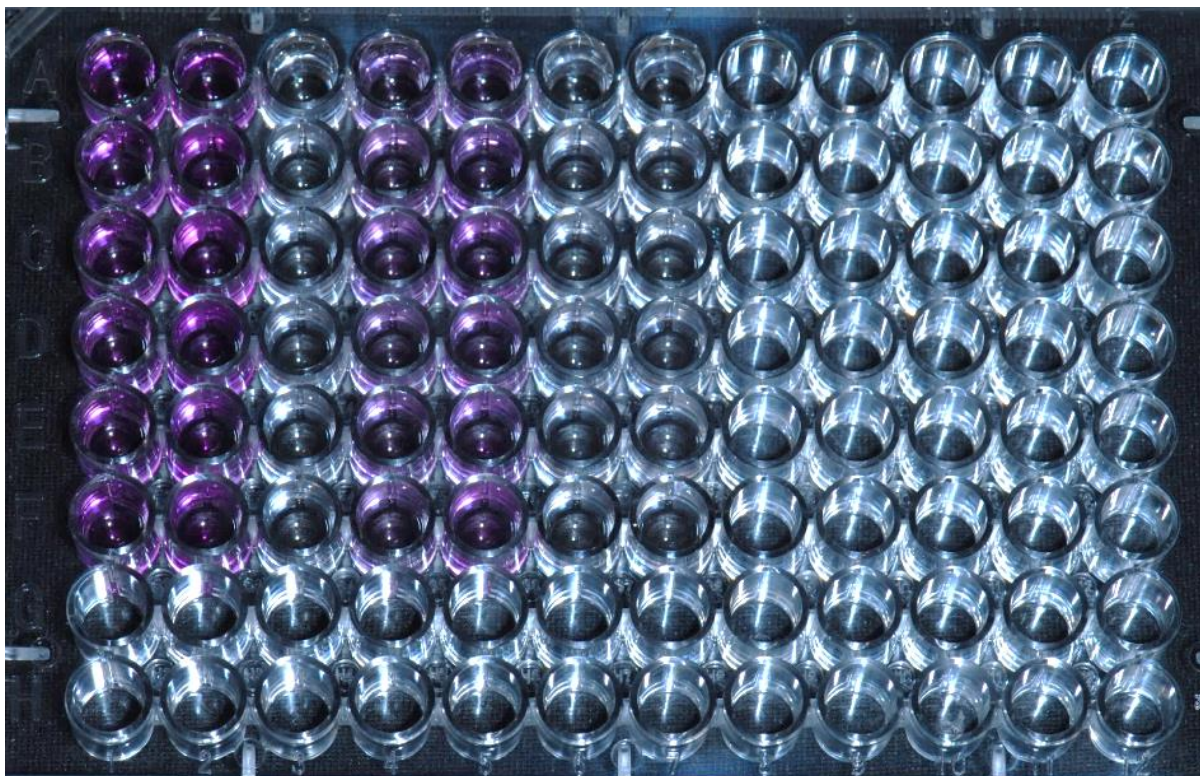


Figura 3: Acréscimo de Dimetil Sulfóxido (DMSO) para leitura. A medida que a solução adquire uma coloração arroxeadada, significa que há maior viabilidade celular.



Figura 4: Leitor automático de microplacas (The Biochrom Asys UVM340, Cambridge, United Kingdom)

3.3 Análise da composição da dentina radicular

3.3.1 Obtenção dos fragmentos de dentina

Foi realizada a coleta de 60 incisivos bovinos (Frigorifico Real, Uberlândia, MG, Brasil). Estes dentes foram limpos e tiveram as coroas seccionadas por disco diamantado na junção cimento-esmalte. Posteriormente, as raízes foram seccionadas em fragmentos de

aproximadamente 3 mm de largura por 3 mm de altura e com espessura determinada na metade do diâmetro do canal (Figura 5). Os fragmentos foram levados em grupos de 5, em *beckers* contendo água destilada, para sua limpeza em uma cuba ultrassônica por um período de 20 minutos (10 minutos com a superfície pulpar para baixo e 10 minutos com a superfície pulpar voltado para o lado).

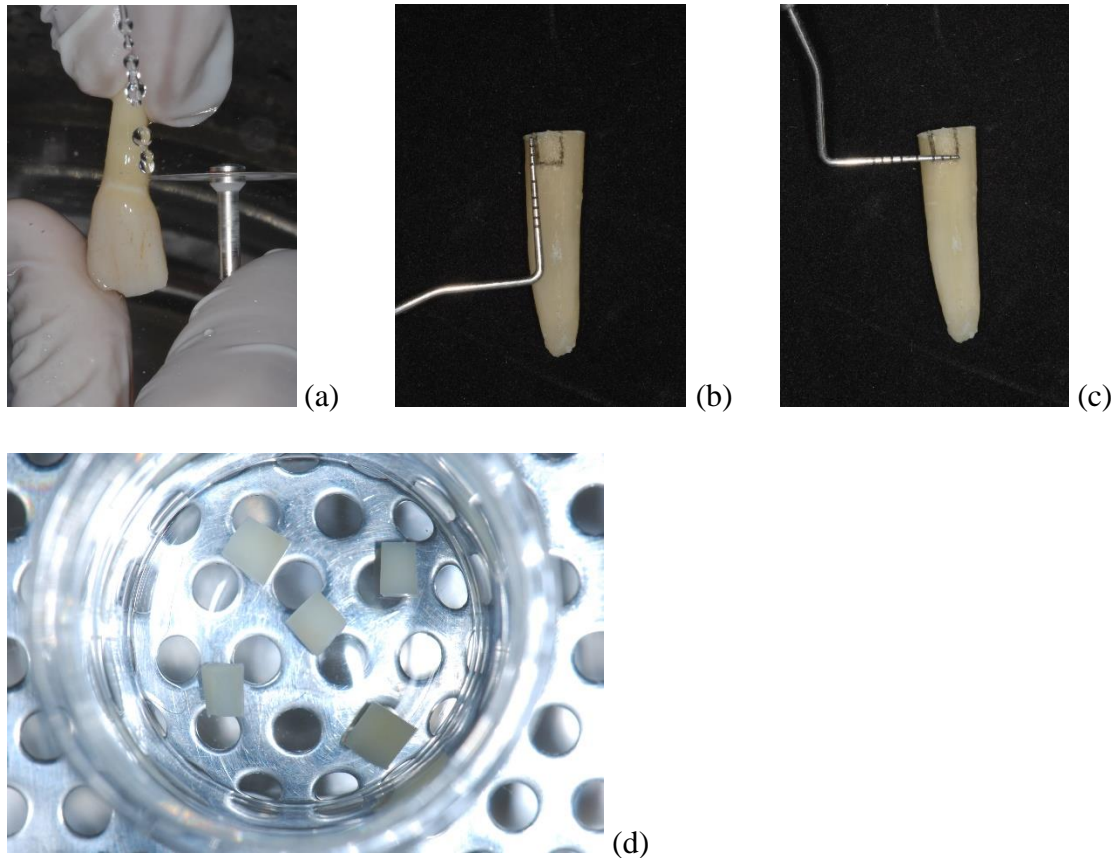


Figura 5: Confeção das amostras. (a)Secção na linha amelodentinária com auxílio de disco diamantado; (b)Delimitando a altura em 3 mm; (c)Delimitando a largura em 3 mm; (d)Fragmentos em grupos de 5 dentro de beakers para limpeza em cuba ultrassônica.

Estas fatias foram divididas em grupos experimentais nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos de acordo com a tabela 1.

Tabela 1: Disposição dos fragmentos para cada meio para análise em FTIR

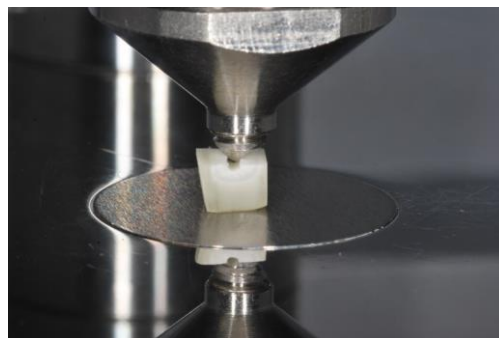
GRUPO		15 min	30 min	45 min	60 min	TOTAL
GLi	Leite Integral	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 20
GRI	Ringer com Lactato	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 20
GPv	Extrato de Própolis Vermelho 6 µg/ml	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 20
GPd	Pedialyte	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 20
GAt	Água de Torneira	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 20
GDM	Meio <i>Eagle</i> Modificado Dulbecco	n = 5	n = 5	n = 5	n = 5	n = 20
TOTAL						n = 120

3.3.2 Análise dos fragmentos no espectrofotômetro de infravermelho por transformada de *Fourier* FTIR

Antes e depois do tratamento com as soluções, as amostras foram analisadas em um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de *Fourier* - FTIR (Jasco Inc., Tóquio, Japão). As amostras foram secas e posicionadas com a parede pulpar voltada para cima, de forma que a superfície radicular seja mantida sobre o suporte de amostras no equipamento, onde a técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR) foi empregada (Figura 6) obtendo os espectros de infravermelho que correspondem à análise da dentina. Cada espectro foi processado pelo software e o resultado da análise é obtido sob a forma de gráfico (Figura 7).



(a)



(b)

Figura 6: Espectrofotômetro de Infravermelho por transformada de *Fourier* - FTIR (Jasco Inc., Tóquio, Japão) (a). Amostra posicionada no ATR de diamante para obtenção dos espectros de infravermelho(b).

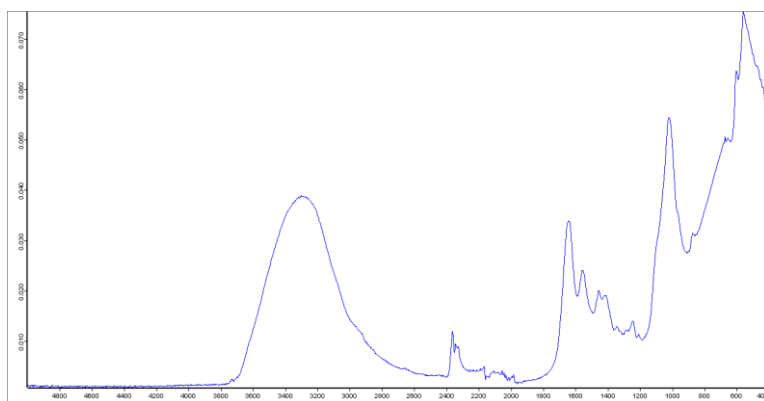


Figura 7: Gráfico processado pelo software.

3.3.3 Análise dos resultados obtidos

Os espectros são registrados pelo FTIR em número de onda, sendo analisadas a bandas OH⁻, relacionada com a adesão celular, e a banda PO₄, referente a matriz inorgânica da dentina. As ondas onde houve discrepância antes do tratamento e depois, tiveram suas áreas calculadas e foram analisadas, a fim de observar as mudanças que ocorreram na composição da apatita da dentina radicular após o tratamento com as soluções.

3.4 Análise estatística

Os dados foram tabulados e submetidos à análise inicial, para detecção de distribuição normal e homogeneidade, por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov e teste de Levene.

Como os valores apresentarem requisitos que possibilite o emprego de análise paramétrica foi empregada análise estatística usando análise de variância, e teste de Tukey e teste de Dunnet para efetivar a comparação aos grupos controles. Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de $\alpha=0.05$.

4 RESULTADOS

PERIÓDICO: DENTAL TRAUMATOLOGY

***IN VITRO* ANALYSIS OF FIBROBLAST VIABILITY AND DENTIN'S IONIC COMPOSITION IN DIFFERENT STORAGE MEDIA**

Ivanilton Alan de Souza Silva¹. Priscilla Barbosa Ferreira Soares². Manuella Verdinelli de Paula Reis³. Carlos José Soares⁴. Juliana Cardoso⁵. Luiz Carlos Ferreira da Silva⁶.

1. DDS, MS, Student of Dental School, UFS - Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil. R. Cláudio Batista s/n, Sanatório, - CEP 49060-100, Aracaju, Sergipe, Brasil. Phone: (79) 2105-1824.

2. DDS, MS, PhD Student of Dental School, School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. Av. Pará, nº 1720 - Bloco 4L Anexo B – Sala 4LA – CEP 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Phone: 55-34-3218 22 55 Fax: 55-34- 3218 2279.

3. DDS, MS, Student of Dental School, School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. Av. Pará, nº 1720 - Bloco 4L Anexo A – Sala 4LA – CEP 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Phone: 55-34-3218 22 55 Fax: 55-34- 3218 2279.

4. DDS, MS, PhD, Department of Operative Dentistry and Dental Materials, School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. Av. Pará, nº 1720 - Bloco 4L Anexo A – Sala 4LA – CEP 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Phone: 55-34-3218 22 55 Fax: 55-34- 3218 2279.

5. DDS, MS, PhD, Department of Farmacology, UNIT – Tiradentes University, Aracaju, Sergipe, Brazil. Av. Murilo Dantas, 300, prédio do ITP, Farolândia CEP: 49032-490 – Aracaju, Sergipe, Brasil. Tel/Fax.: (79) 3218-2190

6. DDS, MS, PhD, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, UFS - Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil. R. Cláudio Batista s/n, Sanatório, - CEP 49060-100, Aracaju, Sergipe, Brasil. Phone: (79) 2105-1824.

Corresponding Author:

Luiz Carlos Ferreira da Silva, School of dentistry, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil. R. Cláudio Batista s/n, Sanatório, - CEP 49060-100, Aracaju, Sergipe, Brasil. Phone: (79) 2105-1824. E-mail: lcsilva@infonet.com.br

Abstract

The preservation of periodontal ligament cells after one tooth avulsion becomes necessary to determine a storage medium. The aim of this study was to analyze the preservation of human fibroblast cells and analyze the composition of root dentin of bovine teeth in different storage media. Immortalized human fibroblasts cells were grown in flasks containing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). After reaching confluence the cells were trypsinized, counted by hemocytometer and plated. The culture medium was removed from each well and the cells were exposed at different times in the solutions: GLi - milk; GRl - ringer's lactate; GPv - red propolis solution and GPd - pedialyte. DMEM was considered positive control group and tap water negative control. After the experimental period, we used the colorimetric method MTT formazan. For analysis of surface composition of root dentin by FTIR were collected 60 bovine incisors. Samples were extracted from the cervical region of the root dentin in 3x4mm. The samples were randomly divided among experimental groups in different times. Data were tabulated and statistically analyzed using analysis of variance for one factor for the storage media within each time and the time factor for each storage medium, followed by Dunnet test and Tukey's test ($P < 0.05$). In 15 and 60 minutes, from the media types, the milk and Ringer's lactate showed better results when compared to the negative control. However, in 30 and 45 minutes only the milk showed satisfactory results. A comparison with DMEM only the milk showed similar statistical results. In assessing the viability of human fibroblasts, milk showed cell viability levels similar to the positive control and superior to other media tested. Within 60 minutes storage, the one most commonly used in clinical conditions, the Ringer's lactate has higher performance than the red propolis and the pedialyte and all these better than tap water (negative control).

Keywords:

Keywords: Periodontal Ligament; Dental avulsion; Culture Media; Fibroblasts; Cell Survival

INTRODUCTION

Traumatic dental injuries represent one of the most common reasons for emergency appointments, and ensuring the survival of traumatized teeth is one of the main responsibilities of dentists and also physicians.¹ During the extra-alveolar period, adherent cells on to the root are subject to contamination and dehydration and might become necrotic. Ideally, the tooth should be replanted immediately after the injury.^{2,3} Teeth that are replanted immediately after avulsion usually show excellent healing and have been found to have a good prognosis. However, this is not always possible, and the problem of tooth preservation is very important for ensuring a successful replantation. Therefore, it is essential to develop storage solutions that can maintain the viability and function of the periodontal ligament (PDL) for longer periods.^{3,4} An ideal storage medium should be one that is capable of preserving the viability, mitogenicity and clonogenic capacity of the damaged PDL cells to facilitate proliferation of these cells over the denuded root surface, thereby preventing further root resorption.⁵ Different storage media such as Hank's balanced salt solution, milk, and saline solution have been used with some success, but an ideal storage medium has not been found.⁶ Likewise, an ideal storage medium should be readily available or easily accessible at the site of an accident. There are many storage media available for avulsed teeth, including milk, physiologic saline solution, egg white, pedialyte⁶, própolis⁷, and Hanks' balanced salt solution (HBSS)⁸. The purpose of this study is to evaluate the influence of different storage media in maintaining human fibroblasts in addition to analyzing the composition of root dentin through infrared spectrometer.

MATERIALS AND METHODS**Cell Culture**

Immortalized human mouth fibroblasts (Cell Bank of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were cultured in T-25 cell culture flasks containing Dulbecco's Modified Eagle

Medium (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA), with 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2 mM/L glutamine (Gibco, Grand Island, NY, USA) in a humidified incubator with 5% CO₂ and 95% air at 37°C (Isotemp; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Growth was permitted until the cells achieved confluence.

Cell Metabolism (MTT Assay)

These cells were detached, counted using a hemocytometer and plated in 96-well plates (Coastar Corp., Cambridge, MA, USA) at an initial density of 2×10^4 cells.well⁻¹ in 100 µL of culture medium. The plates were returned to the incubator for 24 hours. Subsequently, the culture medium was drained from each well and the cells were exposed to 100 µL of the different experimental solutions at room temperature for 15, 30, 45 and 60 minutes. The storage solutions used in the experiments were cow milk (CALU Integral; CALU, Uberlândia, MG, Brazil), Ringer Lactate (HalexIstar, Hospitalar, Goiânia, GO, Brazil), Pedialyte (ABBOTT, São Paulo, SP, Brasil), Red Própolis 6µg/ml and tap water as negative control. The positive control corresponded to cells maintained in 20% DMEM, without additional treatment. After the experimental times ran out, the storage solutions were replaced by 20% DMEM and incubated with MTT solution (5 mg. mL⁻¹) prior to cell viability evaluation. The same protocol was used for the positive control group (DMEM). After 4 h, the MTT solution was removed and 100 µL of dimethyl sulfoxide (Sigma Chemical Co.) were added to each well. Cell viability was determined by measuring the optical density at 540 nm on a microplate reader.

Preparation of the dentin fragments

The collection of 60 bovine incisors was performed (Fridge Real, Uberlandia, MG, Brazil). These teeth were clean and had crowns sectioned with a diamond disc in the cementoenamel junction. Subsequently, the roots were cut into fragments of approximately 3 mm wide by 3 mm high and with a certain thickness in the middle of the channel diameter. The fragments were taken in groups of 15 and the pulp surface positioned downward in distilled water for cleaning with ultrasson for a period of 20 minutes. These slices were divided into experimental groups in the time of 15, 30, 45 and 60 minutes.

Analysis of the fragments in the Fourier transform infrared spectroscopy

Before and after the treatment with the solutions, samples were analyzed on a Fourier transform infrared spectroscopy (Jasco Inc., Tokyo, Japan). The samples were dried and placed in the pulp wall facing upwards so that the root surface is maintained on the sample holder in the machine, which get a diamond ATR (attenuated total reflectance) infrared spectra that correspond to the analysis of dentin. Each spectrum was processed by the software and the test result is obtained in the form of a graph.

Analysis of results

The spectra are recorded by FTIR in wave number, and analyzed the OH⁻ bands, related to cell adhesion, and the PO₄ band, referring to inorganic matrix of dentin. The waves where there was discrepancy before treatment and then had their areas calculated and analyzed in order to observe the changes that occurred in the composition of apatite root dentin after treatment with the solutions.

Statistical analysis

Data were tabulated and submitted to initial analysis for detection of normal distribution and homogeneity through the tests Kolmogorov-Smirnov and Levene. Since the values present requirements that allows the use of parametric analysis, was used statistical analysis using analysis of variance and Tukey test and Dunnett test to effect compared to control groups. All statistical tests were performed with a significance level of $\alpha = 0,05$

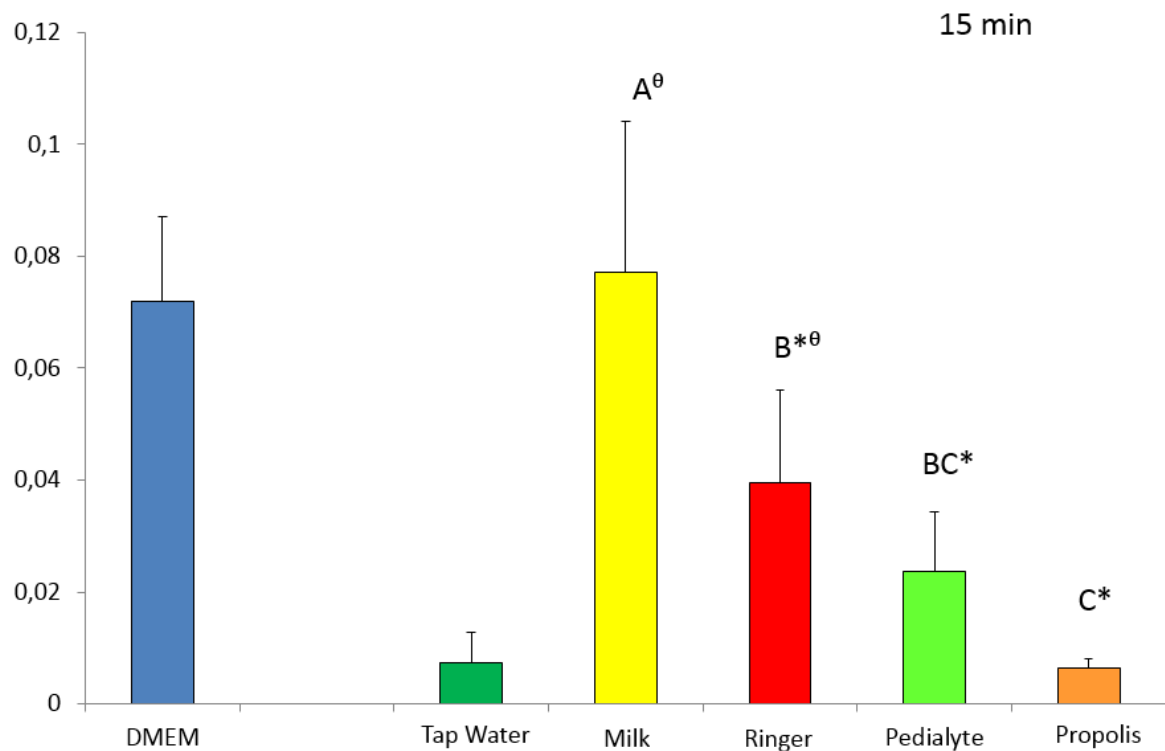
RESULTS

MTT Assay

In the graphs 1-5, comparative analysis with all experimental groups are described. In Graph 1, relating to the experimental time of 15 minutes it appears that the DMEM medium resulted in significantly higher cell viability than those values obtained with ringer's lactate solution, pedialyte and red propolis. The milk had similar values to DMEM, positive control. The Ringer's lactate showed significantly higher values than the red propolis. DMEM, milk and

ringer's lactate resulted in cell viability values greater than those obtained with tap water (negative control).

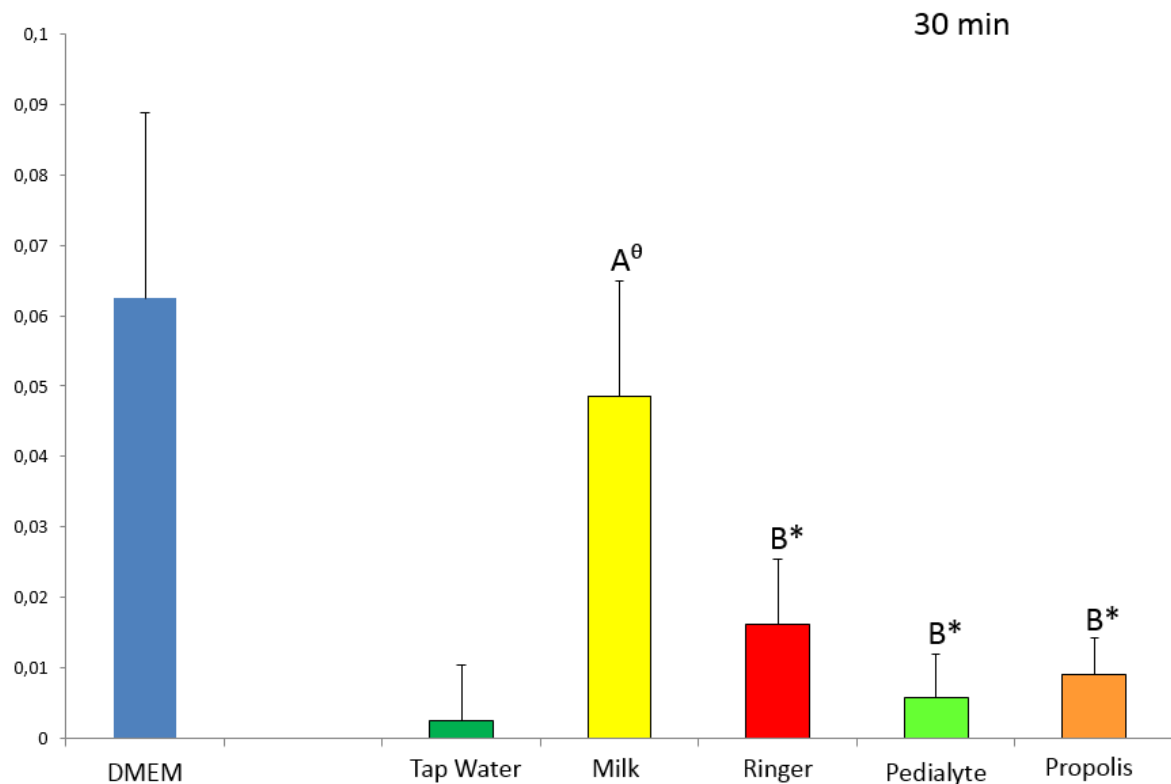
Graph 1: Statistical Analysis of the experimental period of 15 minutes.



Different letters represent statistical differences between the experimental groups. * represents the difference of the experimental groups with DMEM (positive control); ⁰ represents difference between the experimental groups with tap water (negative control).

At 30 minutes (Graph 2) comparing the experimental groups, milk showed cell viability values better than the other experimental means and similar to values obtained with the DMEM (positive control). Among the ringer's lactate, pedialyte and the red propolis no statistical difference was not compared to tap water. The milk was the only experimental medium with cell viability values greater than those obtained with tap water (negative control).

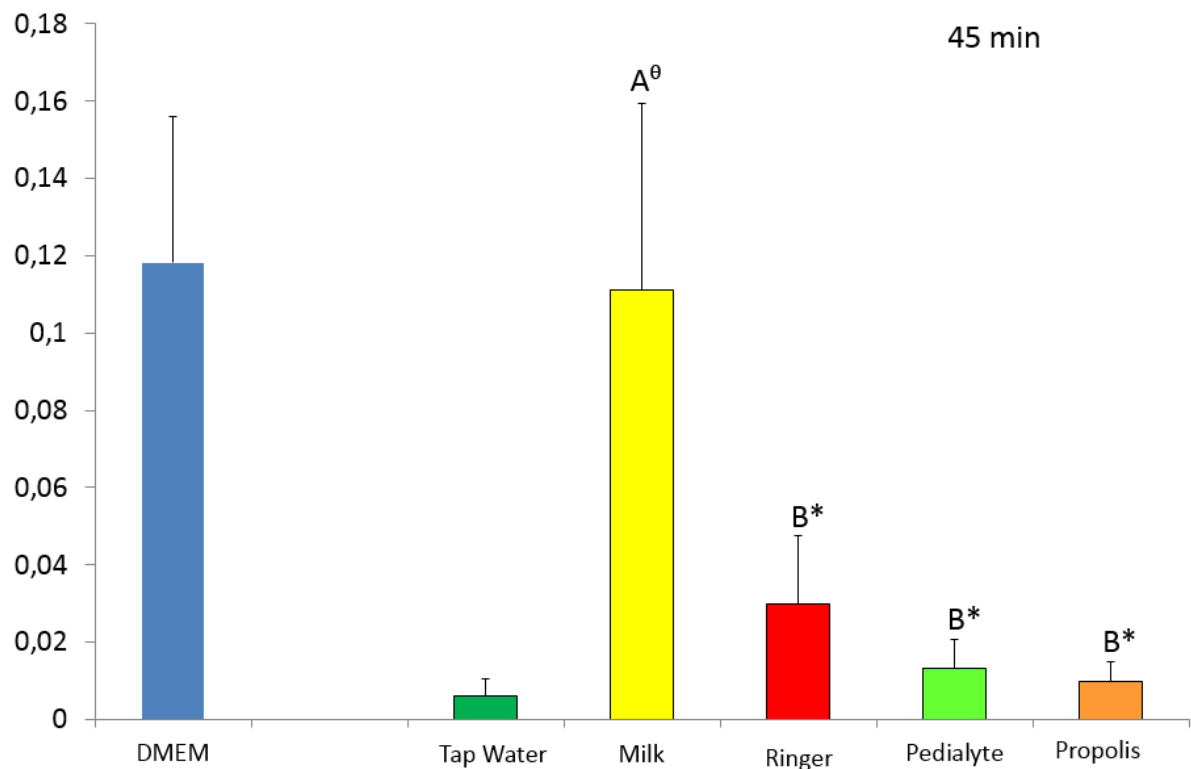
Graph 2: Statistical Analysis of the experimental period of 30 minutes.



Different letters represent statistical differences between the experimental groups. * represents the difference of the experimental groups with DMEM (positive control); ^θ represents difference between the experimental groups with tap water (negative control).

At 45 minutes experimental period (Graph 3) comparing the experimental groups, milk showed cell viability values better than the other experimental means and similar to values obtained with the DMEM (positive control). However, among the ringer's lactate, pedialyte and red propolis was not different even when compared to tap water. The milk was the only experimental medium with cell viability values greater than those obtained with tap water (negative control).

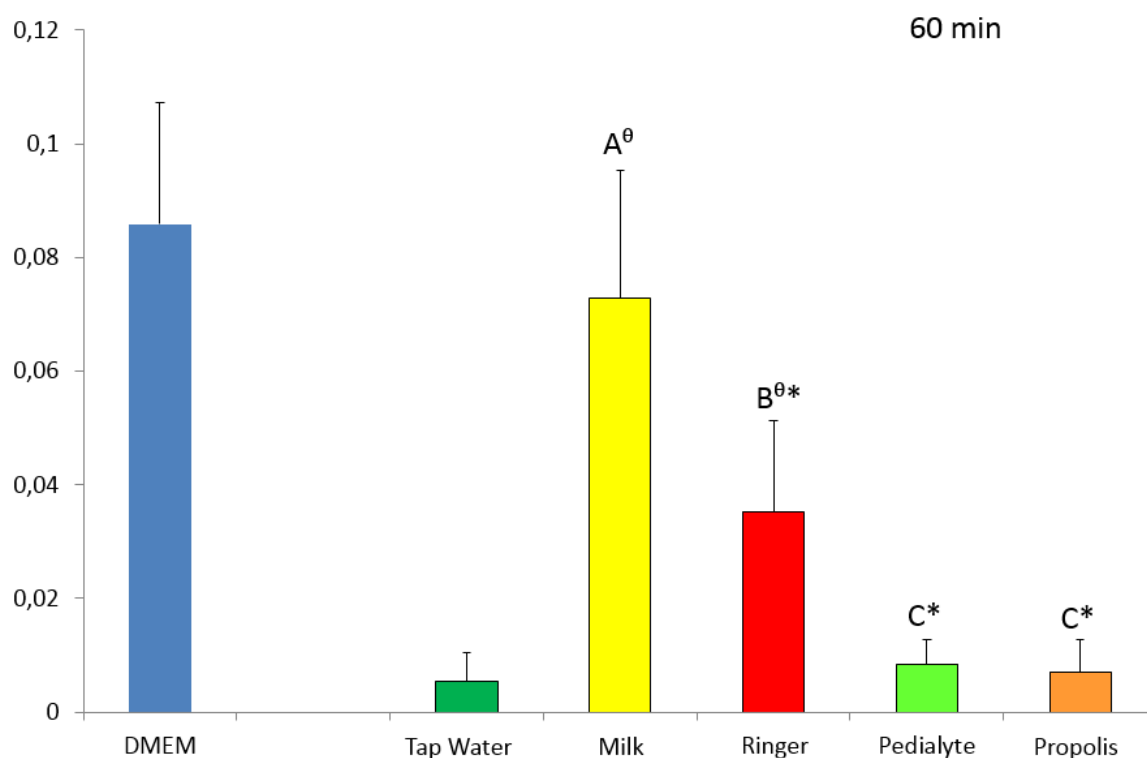
Graph 3: Statistical Analysis of the experimental period of 45 minutes.



Different letters represent statistical differences between the experimental groups. * represents the difference of the experimental groups with DMEM (positive control); ^θ represents difference between the experimental groups with tap water (negative control).

At 60 minutes experimental period (Graph 4) comparing the experimental groups, milk showed cell viability values better than the other experimental means and similar to values obtained with the DMEM (positive control). The ringer's lactate means, pedialyte and the red propolis showed similar results to each other and to those obtained with tap water. The milk and Lactated Ringer, cell viability showed values higher than those obtained with tap water (negative control).

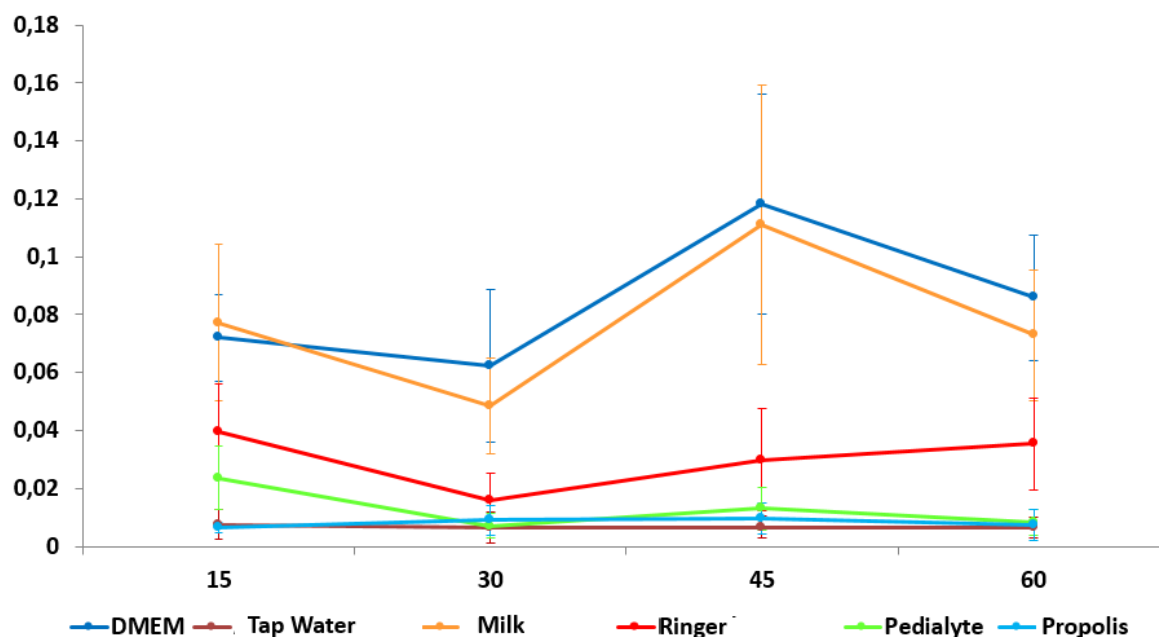
Graph 4: Statistical Analysis of the experimental period of 60 minutes.



Different letters represent statistical differences between the experimental groups. * represents the difference of the experimental groups with DMEM (positive control); ⁰ represents difference between the experimental groups with tap water (negative control).

In Graph 5, the performance is verified of the storage means over the evaluation period. The performance of red propolis and pedialyte were very low regardless of the evaluation period. The ringer's lactate has intermediaries' values of cell viability and kept evenly over the periods. For milk means and DMEM increased slightly viability levels in periods of 45 minutes, with no significant difference among the remaining periods.

Graph 5: Comparative statistical analysis on all experimental times.



4.2 Analysis of the composition of root dentin in the Fourier transform infrared spectroscopy

The analysis of the surface composition of the root dentin after immersion in the storage media measured by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), was performed to verify the availability of ions responsible for enhancing cell viability on the dentin. In Tables 1 to 2 are described analyzes the wavelength spectrum related to stretching OH, PO₄. In Table 1, regarding OH stretching, comparing the times when comparing solutions and solution x time, there was no change statistically significant.

Table 1: The OH⁻ stretching, before and after the experimental times.

Evaluation period	Before				After				P
	15min	30min	45min	60min	15min	30min	45min	60min	
Riger's Lactate	0,003 ±	0,001 ±	0,024 ±	0,022 ±	0,003 ±	0,011 ±	0,029 ±	0,042 ±	66,800
	0,006	0,001	0,021	0,026	0,001	0,005	0,019	0,027	
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
Pedialyte	0,017 ±	0,017 ±	0,017 ±	0,035 ±	0,021 ±	0,026 ±	0,029 ±	0,020 ±	52,525
	0,023	0,024	0,023	0,029	0,031	0,033	0,037	0,022	
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
Propolis	0,034 ±	0,014 ±	0,026 ±	0,019 ±	0,067 ±	0,015 ±	0,034 ±	0,015 ±	55,550
	0,018	0,017	0,015	0,017	0,060	0,027	0,019	0,022	
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
DMEM	0,019 ±	0,019 ±	0,027 ±	0,020 ±	0,030 ±	0,031 ±	0,038 ±	0,017 ±	61,300
	0,020	0,021	0,034	0,022	0,032	0,027	0,045	0,015	
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
Tap water	0,026 ±	0,012 ±	0,071 ±	0,010 ±	0,035 ±	0,013 ±	0,042 ±	0,007 ±	47,375
	0,030	0,014	0,045	0,012	0,023	0,015	0,038	0,010	
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
Milk	0,043 ±	0,043 ±	0,064 ±	0,036 ±	0,058 ±	0,060 ±	0,083 ±	0,075 ±	79,450
	0,029	0,047	0,040	0,017	0,045	0,025	0,052	0,063	
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
P					63,800	63,350	59,283	55,567	

Different letters represent statistical differences. Uppercase letters used to compare the time factor (lines) and lowercase letters used to compare factor type of storage solution (columns), the Tukey test (p <0.05)

Table 2 concerning PO₄ stretching, when we compared the times, solutions and time x solution, also there was no statistically significant change.

Table 2: The PO₄ stretching, before and after the experimental times.

PO ₄ stretching									
Evaluation period	Before				After				P
	15min	30min	45min	60min	15min	30min	45min	60min	
Riger's Lactate	0,003± 0,006	0,001± 0,001	0,024± 0,026	0,016 ± 0,018	0,002± 0,001	0,005± 0,004	0,025± 0,022	0,031± 0,020	61,625
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
Pedialyte	0,014± 0,020	0,013± 0,019	0,015± 0,020	0,031± 0,020	0,017± 0,027	0,021± 0,028	0,026± 0,034	0,020± 0,024	57,325
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
Propolis	0,032± 0,019	0,012± 0,016	0,025± 0,016	0,015± 0,014	0,051± 0,038	0,013± 0,022	0,032± 0,021	0,012± 0,017	57,300
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
DMEM	0,014± 0,016	0,016± 0,020	0,025± 0,032	0,017± 0,018	0,021± 0,026	0,023± 0,023	0,029± 0,036	0,011±0,0 10	62,025
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
Tap water	0,022± 0,027	0,012± 0,014	0,065± 0,042	0,008± 0,010	0,030± 0,024	0,019± 0,015	0,038± 0,047	0,006± 0,009	52,650
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
Milk	0,043± 0,031	0,036± 0,034	0,057± 0,030	0,032± 0,012	0,052± 0,044	0,037± 0,012	0,069± 0,037	0,054± 0,043	72,075
	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	Aa	
P					64,800	61,017	59,167	57,017	

Different letters represent statistical differences. Uppercase letters used to compare the time factor (lines) and lowercase letters used to compare factor type of storage solution (columns), the Tukey test (p <0.05)

DISCUSSION

The tooth avulsion causes injury to the periodontal ligament that are adhered to the root surface. A storage medium should be used for maintenance of viability for long periods. Milk

was one of the first storage media studied which showed satisfactory effectiveness, either for the sake of preserving the cells as at cost^{9,10}.

The hypothesis of this study was that, Ringer's lactate solution, Propolis solution and Pedialyte solution have the same capacity to preserve periodontal ligament cells as milk has. However, the results showed that Milk has statistically preserved more cells than the other three solutions, and the hypothesis was rejected. Milk's better performance in this study was probably due to its higher concentration of carbohydrates, proteins and fat, once other characteristics – pH, osmolarity and electrolytes concentration – were similar between all solutions.

Recent studies have demonstrated red propolis's potential to preserve cells, and one reported that it had a better performance preserving periodontal ligament cells than Hank's balanced salt solution and milk¹³ but this potential was not observed in this study. Some studies have evaluated the properties of red propolis^{11,12}. The red propolis extract shows high concentration of phenolic acids and flavonoids such as formononetin, isoliquiritigenin, liquiritigenin, medicarpin and biochanin that are often associated with a variety of health benefits¹². In fact red propolis showed similar statistical values to the negative control. However, this study used different methods than other studies, and this may have been the cause of the conflicting results.

As red propolis, pedyalite also showed no better performance than the negative control and worst results than Ringers solution and Milk. Pedialyte was presented as a promising medium for the maintenance of cells⁶ but, in this study, pedialyte showed the lower overall pH values. It is known that an acid medium has a negative influence on cell preservation, therefore, this was the probable reason for its negative results

Regarding cell adhesion to dentin surface, we found no statistical difference between the solutions, for all experimental times. All solutions were to adhesion of fibroblasts to root dentin. Some studies indicated that the solution could have an influence on cell adhesion by changing the dentin layer's composition and therefore, promoting an unfavorable surface¹⁵, but this was not observed in this study.

While analyzing means to preserve human fibroblasts, we sought to identify whether this would imply the dentin surface. Many solutions can influence the inorganic dentin's matrix, particularly those with a pH more acidic than neutral¹⁵. The PO4 connection determines the mineral formation of dentin, and when we compare the solutions with each other, although some submit an improper pH for cell preservation, statistically there was no change to the root surface.

Chemically, the hydroxyl radical OH is closely linked to cell adhesion. It is known that at higher ratios there is an enhancement in the binding of fibroblasts to dentin surface. Therefore we seek to investigate whether some of the solutions would influence adherence and in this comparison, all means presented compatible.

This research showed that milk should remain the medium of choice for storage of avulsed teeth. Ringer's lactate solution also showed homogeneous effectiveness in all experimental times becoming an alternative to transport the tooth to the dental office. Ringer's lactate is inexpensive and is advantageous for its use.

CONCLUSION

Milk showed a better potential to preserve periodontal ligament cells, however no difference in ionic composition of dentin methods. Since the milk also has good availability and low cost, there it should still remain the first choice of storage medium for avulsed teeth.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by FAPITEC (Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica no Estado de Sergipe, SE, Brazil). This study was carried out in the CPBIO-FOUFU (Research Center at the School of Dentistry - Federal University of Uberlândia).

REFERENCES

1. Karaylmaz H, Kirzioglu Z, Gungor OE. Aetiology, treatment patterns and long-term outcomes of tooth avulsion in children and adolescents. *Pak J Med Sci* 2013;29:464-468;
2. Souza BDM, Luckemeyer DD, Reyes-Carmona JF, Felipe WT, Simões CMO, Felipe MCS. Viability of human periodontal ligament fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and coconut water as storage media. *Inter Endo J* 2011;44:111–115;

3. Moura CCG, Soares PBF, Reis MVP, Neto AJF, Barbosa DZ, Soares CJ. Potential of coconut water and soy milk for use as storage media to preserve the viability of periodontal ligament cells: an in vitro study. *Dent Trauma* 2014;30: 22–26;
4. Huangqin C, Huang B. (-)-Epigallocatechin-3-gallate: a novel storage medium for avulsed teeth. *Dent Trauma* 2012;28:158–160;
5. Mahal NK, Singh N, Thomas & N, Kakkar M. Effect of three different storage media on survival of periodontal ligament cells using collagenase–dispase assay. *International Endo J* 2013;46:365–370;
6. Macway-Gomez S, Lallier TE. Pedyalite promotes periodontal ligament cells survival and motility. *JOE* 2013 Feb:39;
7. Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, Moraes IG, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. *Dent Trauma* 2010;26:80–85;
8. Jamalpour MR, Soltanian AR, Tootunchi AS, Rosphanipaian M. Temporary preservation of avulsed tooth in oral submucosal tissue: an experimental study in cat. *Dent Trauma* 2014;30:265–269;
9. Blomlof L. Storage of Human Periodontal Ligament Cells in a Combination of Different Media, *J Dent Res* 1980 Nov:60:1904-1906;
10. Blomlof L, Lindskog S, Hammarslrom L. Periodontal healing of exarticulated monkey teeth stored in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1981;89:251-259;
11. Frozza COS, Garcia CSC, Gambato G, Souza MDO, Salvador M, Moura S, and others. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and chem Toxic* 2013;52:137-142;
12. Frozza COS, Ribeiro TS, Gambato G, Menti C, Moura S, Pinto PM, and others. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. *Food and Chem Toxic* 2014;63:195-204;
13. Martin MP, Pileggi R, A quantitative analysis of própolis: A promising new storage media following avulsion, *Dent Trauma* 2004;20:85-89;
14. Zhang X, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Remineralization of partially demineralized dentine substrate based on a biomimetic strategy. *J Mater Sci Mater Med* 2012;23:733–742;

15. Eliadesa G, Mantzouranib M, Labelliah R, Muttic B, Sharmad D. Interactions of dentine desensitisers with human dentine: Morphology and composition. J of Dent 2013;41:28–39.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Na avaliação da viabilidade dos fibroblastos humanos, o leite integral resultou em níveis de viabilidade celular similares ao grupo controle positivo e em geral superior aos demais meios de armazenagem testados. Porém, no período de 60 minutos, período normalmente decorrido até o reimplante dental, o meio ringer com lactato apresentou valores superiores ao pedialyte, própolis vermelho e água de torneira. A água de torneira apresentou valores de viabilidade celular muito baixos independente do período avaliado.
- Analisando a composição iônica da superfície da dentina radicular, por não apresentar nenhuma discrepância estatística significativa, tanto comparando tempos e meios de armazenagem, podemos concluir que, as soluções não influenciam na adesão celular bem como não alteram a matriz inorgânica da dentina. Porém mais estudos são necessários para analisar em maiores períodos de armazenagem.

6 – COMUNICADO DE IMPRENSA (PRESS RELEASE)

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES MEIOS DE ARMAZENAGEM NA VIABILIDADE DE FIBROBLASTOS E NA COMPOSIÇÃO IÔNICA DA DENTINA RADICULAR: ESTUDO *in vitro*

Aracaju, 04 de Fevereiro de 2015 – Pesquisadores da área de odontologia da Universidade Federal de Sergipe – UFS – divulgaram resultado de pesquisa na qual o leite integral comparado com a solução de ringer com lactato, o própolis vermelho e o pedialyte, deve ser adotado como solução para armazenagem de dentes avulsionados (Dentes que caíram acidentalmente) até o período de 60 minutos com grande chance de evitar a perda do dente.

As células que ficam unidas a superfície da raiz dentária, foram cultivadas e avaliadas em diferentes soluções nos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos. Após os tempos experimentais, as células de cada grupo foram contadas e calculadas estatisticamente. Esta pesquisa também buscou analisar a influência destas soluções ao dente. Comparando também nos mesmos tempos experimentais todas as soluções não demonstraram efeito estatístico significativo sobre o dente.

Para realização desta pesquisa, os pesquisadores tiveram a parceria com a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia com apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica no Estado de Sergipe (FAPITEC) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Karayilmaz H, Kirzioglu Z, Gungor OE. Aetiology treatment patterns and long-term outcomes of tooth avulsion in children and adolescents. *Pak J Med Sci* 2013;29:464-468;
2. Silva EJNL, Rollemberg CB, Coutinho-Filho TS, Zaia AA. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of soy milk with diferente storage media. *Dent Trauma* 2013;29:319–322;
3. Eskandarian T, Badakhsh S, Esmaeilpour T. The Effectiveness of Oral Rehydration Solution at Various Concentrations as a Storage Media for Avulsed Teeth. *Iran Endo J* 2013;8:22-24;
4. Mahal NK, Singh N, Thomaz N, Kakkar M. Effect of three different storage media on survival of periodontal ligament cells using collagenase–dispase assay. *Inter Endo J* 2013;46:365–370;
5. Moura CCG, Soares PBF, Reis MVP, Neto AJF, Barbosa DZ, Soares CJ. Potential of coconut water and soy milk for use as storage media to preserve the viability of periodontal ligament cells: an in vitro study. *Dent Trauma* 2014;30: 22–26;
6. Jamalpour MR, Soltanian AR, Tootunchi AS, Rosphanipaian M. Temporary preservation of avulsed tooth in oral submucosal tissue: an experimental study in cat *Dental Traumatology* 2014; 30:265–269;
7. Reis MVP, et al. Histologic and Micro–Computed Tomographic Analyses of Replanted Teeth Stored in Different Kind of Media. *JOE* 2012 may;40;
8. Blomlof L, Lindskog S, Hammarslrom L. Periodontal liealing of exarticulaled monkey teeth stored in milk or saliva. *Scand J Dent Res* 1981;89:251-259;
9. Blomlof L, Storage of Human Periodontal Ligament Cells in a Combination of Different Media. *J Dent Res* 1981 nov;60:1904-1906;
10. Lekic PC, Kenny DJ, Barret EJ. The influence of storage conditions on the clonogenic capacity of periodontal ligament cells: implications for tooth replantation. *Inter Endo J* 1998;31:137–140;
11. Pearson RM. Human Periodontal Ligament Cell Viability in Milk and Milk Substitutes. *J of Endo* 2003 mar;29;
12. Macway-Gomez S, Lallier TE. Pedyalite promotes periodontal ligament cells survival and motility. *JOE* 2013 feb;39;

13. Zunini GS, Rando KAE, Cox RG. Fluid Replacement in Craniofacial Pediatric Surgery: Normal Saline or Ringer's Lactate?. *The J of Cranio Sur* 2011; 22;
14. Mori GG, Nunes DC, Castilho LR, Moraes IG, Poi WR. Propolis as storage media for avulsed teeth: microscopic and morphometric analysis in rats. *Dent Trauma* 2010;26:80–85;
15. Martin MP, Pileggi R. A quantitative analysis of própolis: A promising new storage media following avulsion. *Dent Trauma* 2004;20:85-89;
16. Ozan, F. et al. Effect of propolis on survival of periodontal ligament cells: new storage media for avulsed teeth. *J Endo* 2007;33:570-573;
17. Frozza COS, Garcia CSC, Gambato G, Souza MDO, Salvador M, Moura S, and others. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and chem Toxic* 2013;52:137-142;
18. Frozza COS, Ribeiro TS, Gambato G, Menti C, Moura S, Pinto PM, and others. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. *Food and Chem Toxic* 2014;63:195-204.